

**Plasmids for controlling expression in plants.**

Patent Number: ☐ [EP0494724](#)  
Publication date: 1992-07-15  
Inventor(s): KAISER ASTRID (DE); FROHBERG CLAUS (DE); GATZ CHRISTIANE DR (DE)  
Applicant(s):: INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG (DE)  
Requested Patent: ☐ [JP6339384](#)  
Application Number: EP19920250003 19920106  
Priority Number(s): DE19914100594 19910108  
IPC Classification: A01H5/00 ; C12N15/82  
EC Classification: [C12N15/82B24](#), [C12N15/79](#)  
Equivalents: AU1010592, CA2058900, ☐ [DE4100594](#), HU65428, ☐ [IE920047](#)

---

**Abstract**

---

Plasmids that comprise DNA sequences that permit the expression, controlled in respect of time and location, of a heterologous product in plants are described. The expression is not achieved until an inducer has been added. The DNA sequences include a functional combination of plant expression sequences and bacterial control sequences. Plants that comprise the DNA sequences of those plasmids are also described. Tetracycline is used as an inducer.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-339384

(43) 公開日 平成6年(1994)12月13日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/82	Z N A			
A 0 1 H 1/00				
5/00	Z N A A	8502-2B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8412-4B	5/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数30 F D (全 16 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平4-18239

(22) 出願日 平成4年(1992)1月7日

(31) 優先権主張番号 P 4 1 0 0 5 9 4 . 5

(32) 優先日 1991年1月8日

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 591027525

インスティトゥート フュア ゲンビオロ  
ギッシェ フォルシュング ベルリン ゲ  
ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル  
ハフツング

ドイツ連邦共和国 ベルリン 33 イーネ  
シュトラッセ 63

(72) 発明者 クリスティアーネ ガッツ

ドイツ連邦共和国 ベルリン 33 アスマ  
ンスハウザー シュトラッセ 10アー

(74) 代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミド、植物及び植物の製造法

(57) 【要約】

【目的】 植物中の表現をコントロールするためのプラスミド、このプラスミドのDNA配列を有する植物

【構成】 植物中の異種産物の時間及び場所に関してコントロールされた表現を許容するDNA配列を有するプラスミド。この表現は、インデューサーが添加されるまでは達成されない。このDNA配列は、植物表現配列及びバクテリア表現コントロール配列の機能的組み合わせを包含する。インデューサーとしてテトラサイクリンを使用する。

【効果】 前記プラスミドのDNA配列を有する植物が得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物中のDNA配列の表現の時期及び場所をコントロールするための手段を有するプラスミド。

【請求項2】 そのDNA配列は、異種産物に関してコード化する、請求項1記載のプラスミド。

【請求項3】 コントロール手段は、DNA配列の表現をインデューサーの存在においてのみ有効化するようなものである、請求項1又は2記載のプラスミド。

【請求項4】 コントロール手段は、植物コントロール配列1個とオペレータ1個以上との機能組み合わせより成る、請求項1から3のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項5】 コントロール手段は、オペレータ配列1個以上、リプレッサーに関する遺伝子1個以上が挿入されている植物プロモータを有し、この植物プロモータ、オペレータ及びDNA配列がこのDNA配列がリプレッサーに関するインデューサーの存在でのみ表現されるように配置されている、請求項4に記載のプラスミド。

【請求項6】 各オペレータ配列は、原核又は真核性オリジン有する、請求項4又は5に記載のプラスミド。

【請求項7】 各オペレータは、テトラサイクリン耐性オペロンの調節エレメントを有する、請求項3から6のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項8】 オペレータは、トランスポゾンT<sub>a</sub>10のテトラサイクリン耐性オペロンの調節エレメントを有する、請求項7に記載のプラスミド。

【請求項9】 2個のオペレータ配列が、植物プロモータのTATAエレメントの3'に配置されている、請求項3から8のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項10】 次のもの：ポリリンカー配列、ポリアダニル化信号及び選択可能なマーカーに関してコード化するDNA配列の1以上をも有する、請求項1から9のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項11】 エンハンサーエレメントを有するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータ1個、TATAボックス1個、tetオペレータ2個又は3個及び異種産物に関してコード化するDNA配列1個を有する、請求項9又は10に記載のプラスミド。

【請求項12】 ポリリンカー配列1個、エンハンサーエレメントを有する334bpカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータフラグメント1個、1個のTATAボックス及び2個のtetオペレータを有する99bpオリゴDNAフラグメント1個、異種産物に関してコード化するDNA配列1個、ノバリンシンターゼ遺伝子の203bpポリアダニル化信号1個及び1650bpハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子1個を有する、請求項11記載のプラスミド。

【請求項13】 TATAボックス及び2個のtetオペレータが連結CCCフラグメントと共に、次の配列：  
【化1】

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
CCCACTAGTCTTCGCAAGACCTTTACGTATATAAGGAGATCTCTATCACTGATAGGGAGTG
GGGTGATCAGAAGCGTTCTGGGAAATGCATATATTCCTCTAGAGATAAGTACTATCCCTCAC.

```

```

70      80      90      100
|      |      |      |
TTAACATAA CTCTATCACTGATAGAGTGATCCTTTCTAGA
AATTGTATT GAGATAGTGACTATCTCACTAGGAAAGATCT

```

を有する99bpオリゴDNAフラグメント中に存在する、請求項11又は12に記載のプラスミド。

タが次の配列：

【化2】

【請求項14】 TATAボックス及び3個のオペレー

```

1      10      20      30      40
|      |      |      |      |
CTAGACTCTATCAQTGATAGAGTGTATATAAGACTCTATCAQTGA
TGAGATAGTCACTATCTCACATATATTCTGAGATAQTCACT

50      60      70      80
|      |      |      |
TAGAGTGAACCTCTATCAGTGATACAGTTAACGGTACCT
ATCTCACTTGAGATAGTCACTATGTCAATTGCCATGGAGATC

```

を有する83bp DNAフラグメントと共に存在する、請求項11に記載のプラスミド。

【請求項15】 プラスミドpAT2HyStu4(D SM6280)。

【請求項16】 プラスミドpAT2HyTriple-X(DSM)。

【請求項17】 526bpカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータフラグメント1個、695bp tetリプレッサーフラグメント1個及びオクトピンシスターゼ遺伝子の180bpポリアデニル化信号1個を有する、プラスミド。

【請求項18】 プラスミドpTET1(DSM6281)。

【請求項19】 DNA配列の表現の時期及び場所をコントロールする手段を有する、植物。

【請求項20】 そのDNA配列は、異種産物に関してコード化する、請求項19に記載の植物。

【請求項21】 コントロール手段は、請求項3から10のいずれかに記載のものを有するか又は請求項11から13のいずれかに記載のコントロールエレメントを有する、請求項19又は20に記載の植物。

【請求項22】 請求項1から15のいずれかに記載のプラスミドを有する、請求項19から21のいずれかに記載の植物。

【請求項23】 存在オペレータに関するリプレッサーに関してコード化するDNA配列をも有する、請求項19から22のいずれかに記載の植物。

【請求項24】 オペレータはtetオペレータであり、リプレッサーはtetリプレッサー蛋白質である、請求項19から23のいずれかに記載の植物。

【請求項25】 請求項17又は18に記載のプラスミドを有する、請求項24に記載の植物。

【請求項26】 プラスミドpTET1(DSM6281)、プラスミドpAT2HyStu4(DSM6280)又はプラスミドpAT2HyTriple-X(DSM)を有する、植物。

【請求項27】 タバコ植物である、請求項19から26のいずれかに記載の植物。

【請求項28】 請求項1から14のいずれかに記載のプラスミドを使用する、特異的DNA配列の表現の時期及び場所をコントロールできる植物の製造。

【請求項29】 請求項1から14のいずれかに記載のプラスミド及び相応するリプレッサーに関してコード化するプラスミドを使用する、特異的DNA配列の表現の時期及び場所をコントロールできる植物の製造。

【請求項30】 プラスミドpTET1、pAT2HyStu4及びpAT2HyTriple-Xを使用する、特異的DNA配列の表現の時期及び場所をコントロールできる植物の製造。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物中での遺伝子表現のコントロールを可能にするDNA配列を有するプラスミドに関する。

##### 【0002】

【従来の技術】植物の特性は、その植物細胞核中に新しい遺伝子情報を挿入することにより改良することができる。

【0003】遺伝子情報は、植物中に挿入される際にその植物中に異種産物を生じるDNA配列中に含有されている。

【0004】DNA配列により表現される異種産物は、例えば物質例えば疫病及び化学品に対する抵抗を与える蛋白質、この植物の代謝に介在する酵素、診断剤及び医薬中で使用される蛋白質又は内発的産物の表現を阻止するリボ核酸でありうる。

【0005】これら又は他の遺伝子産物の表現は、適当なコントロール配列の使用によりコントロールできる。

このコントロール配列は、植物そのもののゲノムから単離することができる。その活性が次のパラメータ：光

〔Kuhlemeier等のAnn. Rev. Plant Physiol. (1987), 38, 221-257〕、温度〔Ainley及びKey, Plant Mol. Biol. (1990), 14, 949-966〕、嫌気生活〔Freeling及びBennett, Ann. Rev. Genet. (1985), 19, 297-332〕、損傷〔Keil等のEMBO J. (1989), 8, 1323-1330〕、植物ホルモン〔Guilfoyle, CRC (1985), 247-276〕及びサリチル酸〔Mol等欧州特許第337532号〕によりコントロールされるか又は次の特定の組織：例えば葉〔stockhaus等のEMBO J. (1989), 8, 2445-2451〕、花〔Goldberg, Science (1988) 240, 1460-1467〕又は根〔Lam等のProc. Natl. Acad. Sci. USA (1989), 86, 7890-7894〕中でのみ活性であるコントロール配列は公知である。

##### 【0006】

【発明の構成】本発明は、植物中でのDNA配列の表現の時期及び場所に関するコントロールの手段を有するプラスミドを提供する。このDNA配列は、一般に異種産物に関してコード化する配列であるが、所望の場合には、この配列は、選択された植物宿主中に自然に存在する産物に関してコード化することもできる。

【0007】本発明のプラスミド中で、コントロール手段は、一般に、DNA配列の表現がインデューサーの存在でのみ有効化され、従って、一般にオペレータ1個及びリプレッサーに関する遺伝子1個より成る。有利なコントロール手段は、インデューサーと特異的に反応するものであり、即ち、このインデューサーは新たに構成されたコントロール系とのみ反応し、実質的に、コントロール手段が挿入されるべき植物のゲノム中の他のコントロール系には作用しない。

【0008】本発明は、例えば、異種産物の時期及び場所に関してコントロールされた表現が、インデューサー（このインデューサーは、新たに構成されたコントロール系とのみ反応し、ゲノム中に存在する他のコントロール配列上には認めうる程度の作用をしない）のコントロールされた添加により達成できるように、植物表現コントロール配列とバクテリアコントロール配列とが機能的に組み合わせられて含有するプラスミドを提供する。

【0009】バクテリアコントロール配列と真核組織からの遺伝子表現のためのコントロールエレメントとのこのタイプの組み合わせは、他の任意の組織例えばマウス、ヒトセルライン、蠅及び酵母中でも達成できる。

【0010】本発明は、本発明のプラスミドのDNA配列を有する植物をも提供する。

【0011】自然に生じる調節可能な植物コントロール配列の公知組み合わせとは対照的に、本発明によるプラスミドは、植物表現コントロール配列1個及び1個以上のバクテリアコントロールエレメント例えばリプレッサーオペレーターインデューサー系の機能的組み合わせを有してよい。このような系において、リプレッサー蛋白質は、特異的オペレータ配列に対する高度の親和性と結合する。このオペレータ配列が遺伝子のプロモータ領域内に存在する場合には、この遺伝子の表現は妨げられている。リプレッサー蛋白質は、特異的インデューサー分子（これはリプレッサー蛋白質をDNAから離脱させ、この際、遺伝子活性を誘発する）と反応する。この目的のために、バクテリアコントロール系が入手され、その活性は、次のような活性物質でコントロールされる：例えば抗生物質〔Hillen等のJ. Mol. Biol. (1983), 172, 185-〕、糖誘導体又はアミノ酸誘導体〔Pabo及びSauerによるAnn. Rev. Biochem. (1984), 53, 293-321〕又は芳香族化合物〔Nermud等によるJ. Bact. (1986), 167, 447-454〕。

【0012】本発明は、植物表現コントロール配列1個及び例えばバクテリアコントロール配列のオペレータ配列1個以上を有するプラスミドを提供する。本発明のプラスミドは、1個以上のオペレータ配列が挿入されている植物プロモータを有してよい。この植物プロモータ、オペレータ及び所望産物に関してコード化するDNAの配置は、このDNA配列がリプレッサーに関するインデューサーの存在においてのみ表現されるようであるべきである。

【0013】植物表現配列例えばプロモータ及びバクテリアコントロールエレメント又は本発明に依る他のオペレータの組み合わせにより、次の必要条件：即ちインデューサーが植物中に生ぜず、良好に吸着され、代謝されず又は他の変性も失活化もされず、内発的植物蛋白質上への認識可能な作用を有しない条件が満足される場合に、

特に高度な特異的及び良好なコントロール可能性を生じる。形質転換(transgenic)植物中のバクテリアコントロールエレメントと反応するインデューサーは、植物コントロールエレメントと反応する物質よりも優れた利点を有し、即ち新たに結合された産物の表現のみが悪影響され、植物のゲノム中な自然に存在している遺伝子産物系の表現には悪影響を及ぼさない。

【0014】本発明の当初手段を用いると、リプレッサーの存在での所望産物の表現は、この植物にインデューサーが供給されている間は起こらず、この表現はインデューサーで処理される組織中でのみ起こる。

【0015】前記のように、形質変換植物中での異種産物の表現は、植物プロモータ中へのオペレータ配列の挿入により、コントロール可能になり、リプレッサー蛋白質はそのオペレータ配列に結合し、それにより、表現を妨げ、このリプレッサー蛋白質は、インデューサー（これがその結果として、異種産物の表現をもたらす）の付加の結果として、オペレータ配列へのその結合能力を失なう。従って、このオペレータ配列は、原核又は真核オリジンのものであってよい。

【0016】バクテリアオペレータ配列と植物プロモータとの組み合わせは、2個のオペレータ配列が植物プロモータのTATAエレメントの3'位に配置されている場合に特に有効であることも判明した。

【0017】この植物プロモータの後に、有利にポリリンカー（これは種々の遺伝子配列の挿入を許容する）及び終端領域も存在する。

【0018】テトラサイクリン耐性オペロン例えばトランスポゾンTn10の調節エレメントは、植物プロモータの活性をコントロールするために好適であることも判明した。

【0019】従って、リプレッサー蛋白質は、高度の親和性( $K_{eq}=10^{-11}$ M生理食塩水条件下)で19bpオペレータ配列に結合するポリペプチド207アミノ酸長である〔kleinschmidt等のBiochemistry (1988), 27, 1094-1104〕。

【0020】このリプレッサーテトラサイクリンコンプレックスの $10^{-9}$ Mの高平衡定数は、非常に低いテトラサイクリン濃度でもDNAからのリプレッサーの有効分離を許容する〔Takahashi等のJ. Mol. Biol. (1986), 187, 341-348〕。

【0021】テトラサイクリン、テトラサイクリンの誘導体又は他の化合物（これは、tetリプレッサーへの結合により後者DNA結合能に変化をもたらすことができる）がこのような系に対するインデューサーとして使用できる。

【0022】テトラサイクリンそのものは、殊に有効なインデューサーであることが立証された。それというのも大抵の抗生物質と同様に、膜を通して拡散しやすく、

従って植物細胞により吸収されるからである。植物中には、最初からリプレッサーを不活性化するテトラサイクリン様作用物質は存在しない。

【0023】殊に植物プロモータのTATAエレメントの3'に配置された2個のt e tオペレータを提供することが特に有利であることが判明した。この2個のオペレータ下流に加えて、TATAボックスの1個のオペレータ上流を配置することもより有利である。

【0024】本発明のコントロール手段において、強力なプロモータ例えばカリフラワーモザイクウィルスプロモータを使用するのが好ましい。1個のプロモータは、エンハンサーエレメントを有してよく、例えばカリフラワーモザイクウィルス(CaMV)35Sプロモータは、構成的表現を引き起こすCaMV35Sプロモータエンハンサーエレメント又は、異なる表現パターンを

与える他のエンハンサーエレメントを有してよい。

【0025】本発明によるコントロール手段の例は、エンハンサーエレメント、TATAボックス1個、オペレータ2個又は3個及び異種産物に関してコード化するDNA配列1個を有するカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータフラグメントより成る。

【0026】エンハンサーエレメント例えばCaMV35Sプロモータエンハンサーエレメントを有するカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータフラグメントは、例えば334bpフラグメントであり、TATAボックス及び2個のt e tオペレータは、例えば次の配列を有する99bpオリゴDNAフラグメント中で連結CCCフラグメントと共に存在する：

【0027】

【化3】

```

      1      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |      |
      CCCACTAGTCTTCGCAAGACCCCTTTACGTATATAAGGAGATCTCTATCACTGATAGGGAGTG
      GGGTGATCAGAAGCGTTCTGGGAAATGCATATATTCCTCTAGAGATAGTGACTATCCCTCAC.
  
```

```

      70      80      90      100
      |      |      |      |
      TTAACATAA CTCTATCACTGATAGAGTGATCCTTTCTAGA
      AATTGTATT GAGATAGTGACTATCTCACTAGGAAAGATCT
  
```

カリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータフラグメントは、TATAボックスの付近にこのオペレータ部位を有し、TATAボックスの5'位の1個のオペレータ及びTATAボックスの3'位の2個のオペレータを

次の配列を有する83bp DNAフラグメントと共に有する：

【0028】

【化4】

```

      1      10      20      30      40
      CTAGACTCTATCAGTGATAAGAGTGATATATAAGACTCTATCAGTGA
      TGAGATAGTCACTATCTCACATATATTCTGAGATAGTCACT
      50      60      70      80
      TAGAGTGAAGCTCTATCAGTGATACAGTTAACGGTACCT
      ATCTCACTTGAGATAGTCACTATGTCAATTGCCATGGAGATC
  
```

コントロール系は、1個以上の更なるエレメント例えば次の任意のものの1個以上を有してよい：ポリリンカー配列、ポリアデニル化信号例えばノパリンシンターゼ遺伝子の203bpポリアデニル化信号及び選択マーカー遺伝子例えば抗生物質耐性遺伝子例えば1650bpハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子。

【0029】例えば、コントロール系は、ポリリンカー配列1個、エンハンサーエレメント例えばCaMV35Sプロモータエンハンサーエレメントを有する334bpカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータフラグメント1個、1個のTATAボックス及び2個のt e

tプロモータを有する99bpオリゴDNAフラグメント1個、異種産物に関してコード化するDNA配列1個、ノパリンシンターゼ遺伝子の203bpポリアデニル化信号1個及び1650bpハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子1個を有してよく、99bpオリゴDNAフラグメントは有利に前記の配列を有する。

【0030】E. コリー中の複製系及び形質転換された細胞の選択を許容するマーカーを有する多くのクローニングベクターは、高等植物内に異種遺伝子を挿入するための準備に利用できる。このベクターは、例えばpBR

322, pUC系、M13系、pACYC184等より成る。従って、所望の配列を好適な制限部位でベクター内に挿入することができる。生じるプラスミドは、E. コリー内へ形質転換のために使用される。このE. コリー細胞を適当な栄養培地中で培養し、次いで収穫し、溶解させる。プラスミドを回収する。配列分析、制限分析、電気泳動及び他の生化学-分子生物学的方法を分析法として一般的に実施する。各々の操作の後に、使用DNA配列を切断することができかつ結合して次のDNA配列にすることができる。各々のプラスミド配列は、同じ又は他のプラスミド内でクローニングすることができる。所望の遺伝子を植物中に挿入する方法に応じて、他のDNA配列も必要になりうる。例えば植物細胞の形質転換のために、Ti又はRiプラスミドが使用される場合には、Ti又はRiプラスミドT-DNAの少なくとも右端又は屢々右及び左端は、挿入されるべき遺伝子の側面領域として結合されているべきである。

【0031】植物細胞の形質転換のためにT-DNAを使用することが研究されており、例えば、欧州特許第120516号明細書、HoekemaのThe Binary Plant Vectors System Offset-drukkerij Kanters B. V., Alblasterdam, 1985, Chapter V. Fraley等のCrit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46及びAn等のEMB O J. (1985), 4:277-287に記載されている。

【0032】挿入されたDNAがゲノム中で一旦融合されたら、これは比較的安定であり、原則として再び出てこない。これは、通常、形質転換された植物細胞上に殺菌剤又は抗生物質例えばカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシン又は特にクロラムフェニコールに対して耐性を与える選択マーカーを有する。従って、使用される個々のマーカーは、挿入DNAを含有しない細胞よりも形質転換された細胞の選択を許容すべきである。

【0033】植物宿主細胞中にDNAを挿入するために多くの技術が使用されている。これらの技術には、アグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 又はアグロバクテリウム リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) を形質転換剤として用いるT-DNAでの形質転換、融合、注入又はエレクトロポレーション (electroporation) 並びに他の可能な方法が包含される。この形質転換のためにアグロバクテリウムを使用する場合には、挿入されるべきDNAを、特定のプラスミド中即ち中間ベクター内にもバイナリーベクター内にもクローニング導入すべきである。この中間ベクターは、T-DNA中の配列に相同である配列に依存する相同組換えによりTi又はRiプラスミド

中に組み込むことができる。Ti又はRiプラスミドは、T-DNAの転移のために必要であるvir領域をも有する。中間ベクターそのものは、アグロバクテリア中で複製できない。この中間ベクターは、ヘルパープラスミドの使用によりアグロバクテリア ツメファシエンス中に転移することができる (接合)。バイナリーベクターそのものは、E. コリー中でもアグロバクテリア中でも複製できる。これらは、選択マーカー遺伝子及びリンカー又は右及び左のT-DNA端領域で枠付けされているポリリンカーを有する。これらは、直接アグロバクテリア中に転移することができる [Holster等のMol. Gen. Genet. (1978), 163:181-187]。宿主細胞として使用されるアグロバクテリウムは、vir領域を有するプラスミドを有すべきである。このvir領域は、T-DNAを植物細胞中に転移するために必要である。付加的なT-DNAも含有されうる。このように形質転換されたバクテリアを植物細胞の形質転換のために使用する。このDNAを植物細胞中に転移するために、植物外植片をアグロバクテリウム ツメファシエンス又はアグロバクテリウム リゾゲネスと共に培養することができる。次いで、植物全体を、選択のための抗生物質又は殺菌剤を含有してよい適当な媒体中で感染植物材料 (例えば葉、茎、根又はプロトプラスト又は懸濁培養細胞) から再生させることができる。このようにして得られた植物は、挿入DNAの存在を試験するために使用できる。インジェクション及びエレクトロポレーションの場合に、特別なプラスミドの要求はない。通常のプラスミド例えばpUC誘導体を使用することができる。

【0034】形質転換された細胞は、植物内で通常の方法で生長する。植物は通常法で生長させ、同じ形質転換された遺伝因子又は他の遺伝因子を有する植物と交配させることができる。生じるハイブリッド個体は相応する形質特性を有する。

【0035】本発明のコントロール系は、適当なリプレッサー蛋白質が存在する場合にのみ植物中で機能することが認められ、例えばコントロール手段がtetオペレータより成る場合には、tetリプレッサーが提供されるべきである。従って、宿主植物が適当なリプレッサーを産生しない場合には、このリプレッサーを産生する手段、即ちリプレッサーに関してコード化するDNAを有する植物を提供することが必要である。

【0036】一般に、これは、適当なベクター中のリプレッサーを得るための遺伝子又は適当な遺伝子フラグメントのクローニング及びこの遺伝子の植物中への挿入により達成することができる。好適なベクターの構成中で、宿主植物中でのリプレッサーの表現を確保するために、適当な植物表現コントロールエレメントが提供されるべきである。例えば強力な例えば構成的植物プロモータを使用するのが有利である。

【0037】植物宿主細胞中にDNAを挿入するために好適な技術は、前に記載されている。

【0038】本発明は、リプレッサー例えばtetリプレッサーに関してコード化するDNAを有するプラスミドを提供し、かつ本発明のコントロール手段及び適当なリプレッサーに関してコード化するDNAを有する植物を提供する。

【0039】更に、本発明は、本発明のコントロール手段（これはオペレータを包含する）を有するプラスミドの使用及び一般的に、適当なリプレッサーに関してコード化するDNAを有するプラスミドを、DNA配列の表現が時期及び場所でコントロール可能である植物の生産に使用することを提供する。

【0040】本発明の形質転換植物中での所望の産物の表現の時期及び場所に関するコントロールは、この植物中に挿入されているコントロール系を得るためのインデューサーの添加により達成され、表現は、このインデューサーが存在する場合にのみ起こり、インデューサーが存在する場所のみで起こる。

【0041】時期に関するコントロールは、例えばインデューサーの適用のタイミング、頻度及び数により達成できる。

【0042】本発明の形質転換植物と共に使用するために、インデューサーは、リプレッサーに達することが可能であるべきであり、即ち、この形質転換植物は、インデューサーを吸収できるべきであり、この植物内に入ったら、このインデューサーはリプレッサーに到達可能であるべきであることは明らかである。更にこのインデューサーは植物に対して毒性であってはならない。

【0043】前記のように、テトラサイクリンは、前記の基準を満たす。他の好適なインデューサーには、リプレッサーに結合し、そのDNA結合能を廃するテトラサイクリン誘導体も包含される。選択インデューサーを得るために適当なオペレータ／リプレッサー系を、ここに記載のように、例えばテトラサイクリンオペレータ／リプレッサー系と同様に植物中に導入することができる。

【0044】用語及び略語は次の意味を有する：

b p, k b = 塩基対、キロ塩基、

DNA = デオキシリボ核酸、遺伝子情報のキャリア

PNA = リボ核酸

HEPES = N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-

N'-2-エタンスルホン酸

kDa = キロダルトン

SDS = ドデシル硫酸ナトリウム

トリス = トリス (2-アミノエチル) アミン

EDTA = エチレンジアミン四酢酸

mモル = ミリモル

fモル = フェムトモル

次のプラスミドを、ドイツ国ブルンスウィック (Brunswick) 在のドイッche・ザンムルング・フォン

・ミクロオルガニズメン (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen: DSM) に1990年12月23日に寄託した。

【0045】プラスミドpTET1 (DSM6281) プラスミドpAT2HyStu4 (DSM6280)。

【0046】図面の説明

図1は、10.7kbプラスミドpTET1の制限地図である。略字は次のものを意味する：

LB = T-DNAの左端配列

RB = T-DNAの右端配列

CaMV35S = カリフラワーモザイクウイルスのプロモータ (526bp)

tetR = テトラサイクリンリプレッサーの構造遺伝子 (695bp)

ocs = オクトピンシンターゼ遺伝子 (180bp) のポリアデニル化信号

np11 = ノパリンシンターゼプロモータ (1200bp) のコントロール下における、ネオマイシンホストトランスフェラーゼのキメラ遺伝子

例1に記載の切断部位も示されている。

【0047】図2は、形質転換タバコ植物中の機能的tetリプレッサーを検査するための電気泳動のオートラジオグラムである。1~10の位置に、<sup>32</sup>P-ラベルされたオペレータフラグメント (360bp) 6fモルを、かつ11~20の位置に20fモルを導入した。1~4の位置では、tetリプレッサー (エシエリキア・コリーから精製) 0 (対照)、20、60及び120fモルの存在で結合反応を実施した。5~10の位置では、プラスミドpTET1のT-DNAを有する形質転換植物の葉からの蛋白質抽出物0 (対照)、1、2、4、6及び8μgの存在で結合反応を実施し、11~14の位置では、tetリプレッサー (エシエリキア・コリーから精製) 0 (対照)、10、100及び200fモルの存在でこの結合反応を実施し、15~20の位置では、プラスミドpTET1のT-DNAを有する形質転換植物のプロトプラストからの蛋白質抽出物0 (対照)、1、2、4、8及び16μgの存在で結合反応を実施した。

【0048】略字は次の意味を有する：

R = tetリプレッサーDNAコンプレックス

F = 非コンプレックスDNA

図3は、15kbプラスミドpAT2HyStu4の制限地図である。略字は次の意味を有する：

LB = T-DNAの左端配列

RB = T-DNAの右端配列

CaMV35S = 2個のtetオペレータを有するカリフラワーモザイクウイルスのプロモータ (エンハンサー) (334bp)

oligo = TATAボックス、2個のtetリプレッサー及び切断部位SpeI、SnaBI、BgLII、



Hpa I及びXba Iを有するDNAフラグメント (99bp)

gus=エシエリキア・コリーからのβ-グルクロニダーゼの構造遺伝子 (1800bp)

nos=ノバリンシンターゼ遺伝子 (203bp) のポリアデニル化信号

hpt I=ノバリンシンターゼプロモータのコントロール下における、ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ (1650bp) のキメラ遺伝子

npt II=ノバリンシンターゼプロモータ (1200bp) のコントロールFにおける、ネオマイシンホストランスフェラーゼのキメラ遺伝子

例2に記載の切断部位も示されている。図4は、プラスミドpTET1及びプラスミドpAT2HyStu4のT-DNAを有する6個の形質転換植物の葉からの抽出物 (位置1~6) 中のgus遺伝子のテトラサイクリン依存表現を検査するためのノーザンブロット分析のオートラジオグラムである。

【0049】+=テトラサイクリンでの浸透の後の形質転換植物の葉からのRNA

-=テトラサイクリンで浸透しなかった形質転換植物の葉からのRNA

図5は、種々の濃度のテトラサイクリン (Tc 0.1, 0.5, 1及び10mg/l) で浸透後の、及び対照 (Tc 0mg/l) の形質転換された植物の葉からの抽出物 (位置1~5) 中のテトラサイクリン誘導の濃度依存性を特徴付けるためのノーザンブロット分析のオートラジオグラムである。

【0050】略字は次の意味を有する:

Tc=テトラサイクリン

gus=エシエリキア・コリーからのβ-ガラクトシダーゼのmRNA

tetR=tetリプレッサーのmRNA

図6は、形質転換植物 (位置1~6) の葉からの抽出物中のテトラサイクリン誘導の時間における展開を特徴付けるためのノーザンブロット分析のゲルを示している。試料は、0 (対照)、0.5、1、3、6及び22時間 (h) 後に採った。

【0051】略字は次の意味を有する:

gus=エシエリキア・コリーからのβ-グルクロニダーゼのmRNA

tetR=tetリプレッサーのmRNA

図7は、形質転換植物の葉中のgus-表現の場所的誘導を示す、葉の写真。

【0052】本発明の基礎となる実施例を理解するために、前記試験に必要とされかつ自他公知である全ての方法をまず第1に以下記載する:

#### 1. クローン化方法

ベクターpUC18/19 (Yanisch-Perron他, Gene (1985), 33, 103~119) をクローン化に

使用した。

【0053】植物の形質転換のために、遺伝子構造をバイナリーベクターBIN19中にクローン化した (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984), 12, 8711~8720)。標準法を公知方法により実施した (Molecular Cloning, Maniatis他, (1982), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

#### 【0054】2. 細菌の菌株

遺伝子型F<sup>-</sup>, 末端A1, hsdR17, (rk<sup>-</sup>, mx<sup>-</sup>), supE44, thi<sup>-</sup>I, R<sup>-</sup>, recA1, gyrA96, rdA1, φ80d lacZ ΔM15のE. コリ菌株DH5αをpUCベクターに使用した。

【0055】植物の形質転換をアグロバクテリウム・トウメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 菌株GV2260、Deblaere他, Nucl. Acids Res. 13, 4777~4788, (1985) により実施した。

#### 【0056】3. アグロバクテリウム・トウメファシエンスの形質転換

アグロバクテリア中へのDNAの挿入を、ホルスターズ (Holsters) 他 (Mol. Gen. Genet. (1978), 163, 181~187) によって開発された方法により直接形質転換することによって行なった。形質転換されたアグロバクテリアのプラスミドDNAをビルンボイム (Birnboim) およびドーリー (Doly) (Nucl. Acids Res. (1979), 7, 1513~1523) によって開発された方法により単離し、かつ適当な制限切断の後にゲル電気泳動によって分離した。

#### 【0057】4. 植物の形質転換

牛抽出液0.5%, イースト抽出液0.1%, ペプトン0.5%, スクロース0.5%および2mMの硫酸マグネシウムからなるYEB培地中のアグロバクテリウム・トウメファシエンスの1晩置いた培養液10mlを遠心分離し、上澄み液を廃棄し、細菌を同量の抗生物質不含の媒体中に再懸濁させた。滅菌されたペトリ皿中で、葉脈を取除いた滅菌された植物の葉 (約1cm<sup>2</sup>) を細菌の懸濁液中に浸漬した。次に、この葉を、スクロース2%およびバクタアガル0.8%を有するMS培地 (Mura shigeおよびSkoog, Physiologia Plantarum (1962), 15, 473~497) を含有するペトリ皿中に密集させて置いた。25℃で暗中で2日間のインキュベーション後に、葉を、カナマイシンまたはハイグロマイシン100mg/l、クラホラン500mg/l、ベンジルアミノプリン (BAP) 1mg/l、ナフチル酢酸 (NAA) 0.2mg/lおよびバクタアガル0.8%を含有するMS培地上に移した。成長している苗条を、クラホラン250mg/lおよびカナマイシンまたはハイグロマイシン50mg/lを有するホルモン不含のMS培地上に移した。

【0058】培地上に根を形成した苗条を研究すべきDNA配列の組込みについてノーザンブロット分析法およびサザンブロット分析法によって試験した。

【0059】5. 形質転換した植物のゲノムDNAの分析

ゲノム植物DNAの単離をロジャース (Rogers) およびベンディック (Bendich) (Plant Mol. Biol. (1985), 5, 69~76) により行なった。

【0060】DNA分析のために、適当な制限切断の後にDNA20 $\mu$ gを、研究すべきDNA配列の組込みについてサザンブロット法により分析した。

【0061】塩化ナトリウム3モルおよびクエン酸ナトリウム0.3モルを含有するSSC緩衝液中のDNAを膜上に吸い取った。ハイブリッド化を、ポリエチレングリコール10%を含有するアマシノ (Amasino) (Anal. Biochem. (1986), 152, 304~307) によるハイブリッド化緩衝液中で行なった。組込まれたDNA配列を検出するために、DNA断片を放射能標識化した。

【0062】6. 形質転換した植物からの全RNAの分析

植物の全RNAの単離をロウジマン (Logemann) 他 (Analytical Biochem. (1987), 163, 16~20) の方法により実施した。

【0063】分析のために、全RNAの一部30 $\mu$ gを転写ソート (sought) の存在についてノーザンブロット法により研究した。ブロットおよびハイブリッド化をサザンブロット分析法の記載と同様の方法により実施した。

【0064】8. 形質転換した植物中のtetracyclineの検出

プラスミドpTET1のT-DNAを有する植物からの葉物質100mgを、凍結することなしに、抽出緩衝液200 $\mu$ l (磷酸二水素ナトリウム/磷酸水素ジナトリウム50mM、pH7.5、EDTA1mM、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール0.1%、 $\beta$ -メルカプトエタノール10mM、亜硫酸水素ナトリウム2mM、フェニルメチルスルホニルフルオリド2mM、アンチパイン1 $\mu$ g/ml、アプロチニン1 $\mu$ g/ml、キモスタチン1 $\mu$ g/ml、ロイペプチン1 $\mu$ g/ml、ペプスタチン1 $\mu$ g/mlおよびポリビニルピロリドン0.1g/葉物質1g) 中で均質化した。

【0065】結合反応をトリス緩衝液40 $\mu$ l (塩化ナトリウム50mM、塩化マグネシウム10mMおよびトリス/HCl 10mM、pH7.5) 中で実施し、この場合緩衝液には0.6Ci  $^{32}$ P/ミリモルの特異的活性を有する $^{32}$ P-末端標識化オペレーター5~20fモルおよびヘリング精子DNA80 $\mu$ gが添加された。次に、葉抽出液0.5~10 $\mu$ lを結合反応混合物に添

加した。室温で15分間のインキュベーション後に、十分なグルセロールを添加し、溶液25%を得た。この溶液をポリアクリルアミドゲル5%に添加し、かつゲル電気泳動によって分離した。電気泳動を2.5V/cmで12時間トリス緩衝液pH8.0 (トリス60mM/塩基、硼酸60mM、EDTA1mMおよびグリセロール10%) 中で実施した。次に、ゲルを乾燥した。生じた放射能バンドは、オートラジオグラフィーによって目に見えるようになった。

【0066】9. 原形質体の製造

プラスミドpTET1のT-DNAを有する無菌植物の葉からの原形質体をダム (Damm) およびウィルミツァー (Willmitzer) (Mol. Gen. Genet. (1988), 213, 15~20) によって開発された方法により得た。原形質体の数を数え、この原形質体を遠心分離によって濃縮し、かつ抽出緩衝液100 $\mu$ l中に入れ、この場合には、緩衝液100 $\mu$ l中に原形質体300000個が含有されていた。原形質体はこの緩衝液中で溶解した。次に、細胞の屑を遠心分離した。

【0067】10. グス (Gus) 活性の検定

蛍光測定によるグス検定のために、外植片を均質化し、基質4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -Dグルクロニドと一緒に37°Cでインキュベートした。蛍光の定量化をジェファーソン (Jefferson) (Plant Mol. Biol. Rep. 5, 387~405, 1987) の方法により実施した。蛋白質濃度をブラッドフォード (Bradford) (1979) の方法により測定した。生体内染色のために、無菌の植物物質に1mM X-Gluc (5-ブロム-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -Dグルコン酸シクロヘキシルアンモニウム) を真空浸透させ、かつ1晩中37°Cでインキュベートした。

【0068】実施例

例1

プラスミドpTET1の製造およびタバコの植物ゲノム中へのプラスミドのT-DNAの挿入

2個のプラスミドBINAR (Hoefgen and Willmitzer, Plant Science (1990), 66, 221~230) およびpWH305 (Ohemichen他, EMBO J. (1984), 3, 539~543) をプラスミドpTET1の製造に使用した。BINARプラスミドは、バイナリーベクターBIN19の誘導体であり (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984), 12, 8711~8720)、この誘導体は、ポリリンカーのEcoRI部位と、HindIII部位との間にカリフラワーモザイク病ウイルス (CaMV) の35S RNAのプロモーターを含有し、このプロモーターは、構成表現をもたらす、ならびにオクトピンシスターゼ遺伝子のポリアデニル化信号をもたらす。プロモーターと、ポリアデニル化信号との間に位置しているのは、次の切断部位である: KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI

I、Pst I。pWH305からの695 bp Hpa I断片をSma I切断部位中に挿入した。Hpa I断片は、5' - 非翻訳リーダーの18 bp、構造遺伝子の624 bpおよびtet R遺伝子の3' - 領域を含有する。Sma I切断部位は、クローニング化プロセスの間に失われた。プラスミドpTET1は、10.7 kbの全体寸法を有し、これは次のものから構成されている：EcoRI部位と、KpnI部位との間には、CaMV 35Sウィルスの526 bpプロモーター断片が存在し(Covey and Hull (1985) Advance in Cauliflower Mosaic Virus Research, Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 2, 339~346)；KpnI部位と、BamHI部位との間には、tet R遺伝子の695 bp断片が存在し；BamHI部位と、SphI部位との間には、上記の切断部位を有するポリリンカー配列が存在し；SphI部位と、HindIII部位との間には、オクトピンシンターゼ遺伝子の180 bpポリアデニル化信号が存在する。前記プラスミドが植物ゲノム中に組込まれた場合には、直ちにこのプラスミドの一部は、全組織中のtetリプレッサー蛋白質の合成をもたらす。EcoRI部位およびHindIII部位の外側の配列は、ベクターBIN19の配列である。前記外側の配列は、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)およびアグロバクテリウム・トウメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)の場合のプラスミドの複製および選択、ならびに植物中へのT-DNAの転移およびカナマイシン上での形質転換された植物細胞を選択するためのポテンシャルのための全機能を有する。耐性は、nptII遺伝子によって与えられる。前記プラスミドをアグロバクテリウム・トウメファシエンス中に入れて形質転換した。次に、タバコ植物中へのDNA転移をタバコ植物からの葉の薄片を用いてアグロバクテリアの共培養によって実施した。選択をカナマイシン上で実施した。無菌の稔性の植物を形質転換した細胞から再生した。

【0069】独立に形質転換した植物をノーザンブロット分析法によってtetリプレッサーに対するmRNAの合成について試験した。

【0070】既に知られているように、独立の形質転換した植物中のmRNAの量は、著しく変動する(Sander 他, Nucl. Acids Res. (1987), 15, 1543~1558)。合成されたmRNAの最高の効率を有する植物を全ての他の分析のために使用した。

【0071】前記植物中の機能的tetリプレッサー蛋白質の量を定量化するために、ゲル遅延分析をフライド(Fried)およびクロウサーズ(Crothers) (Nucl. Acids Res. (1981), 9, 6505~6525)の方法により実施した(図2、参照)前記方法は、蛋白質DNA複合体が非結合DNAの場合(図2中のバンドF参照)よりもポリアクリルアミドゲル5%上での電気泳動

の間にいっそう遅速になる(図2中のバンドR参照)という事実を利用している。tetリプレッサーの合成のための転写を合成する、1つの植物の葉からの粗製抽出液の蛋白質1~8 μgを、精製された「32P-末端標識化されたオペレーター断片6 fモルと一緒にインキュベートし、かつアポリアクリルアミドゲル5%上で電気泳動を行なった。図2に示したように、位置5~10中の断片の移動度を位置2~4の場合と同程度に遅延させ、この場合にはE. コリから精製されたリプレッサー蛋白質を結合反応に使用した。この蛋白質は、オーエミッペン(Ohemichen) 他(EMBO J. (1984), 3, 539~543)による精製法により得られた。前記位置は、植物抽出液中で生じるオペレーター結合蛋白質がtetリプレッサーと同じ電気泳動移動度を有するということを示すための対照として役立つ。従って、tet R転写を含有する植物は、機能的tetリプレッサーを合成するものと推測することができる。形質転換されていないタバコ植物からの抽出液を用いた場合には、遅延は全く観察されなかった。結合反応の場合のオペレーター断片の濃度は、 $0.25 \times 10^{-9}$  Mである。本明細書中で使用される塩溶液条件下(塩化ナトリウム50 mM、塩化マグネシウム10 mM)でオペレーターDNAに対するリプレッサーの結合定数は、 $> 0.5 \times 10^{-11}$  Mである(Kleinschmidt 他, Biochemistry (1988), 27, 1094~1104)。従って、リプレッサーの量を計算するために、定量的結合は前記条件下で起こることを推測することができる。それぞれ24 kDaの分子量を有する4個の単量体の結合は、断片の完全な遅延を生じるので、トラック8に対して、tetリプレッサー24 fモルの量が蛋白質の全体量の0.01%を構成する蛋白質抽出液4 μg中に含有されることが計算された。細胞1個当たりのtetリプレッサーの数を確認するために、同じタバコ植物の原形質体を得た。図2中の位置15~20は、5000、10000、20000、40000および80000個の原形質体の抽出液が使用された滴定試験を示す。DNA断片20 fモルを試験に使用した。約18 fモルが位置20で遅延され、これは80000個の原形質体中のリプレッサー72 fモルを示す。リプレッサー72 fモルは $4.5 \times 10^{-10}$ のリプレッサー分子と当量であるので、分析された植物の場合に細胞1個当たり500000個のリプレッサー分子の合成速度が存在するものと推測することができる。

#### 【0072】例2

プラスミドpAT2HyStu4の製造およびtetリプレッサーを合成するタバコ植物中へのオペレーター含有CaMV 35Sの安定な組み込み

tetリプレッサーが結合する2個のtetオペレーター配列を、CaMV 35Sプロモーターと組み合わせるために、次のクローニング工程を目的とする。ポリメラー

ゼIIによって確認される最も多数の他の真核生物プロモーターのように、CaMV 35SプロモーターはTATAボックスを有し、このボックスの付近で一般に転写ファクターは活性であり、かつ付加的に5'位のエンハンサーは、CaMV 35Sの場合に植物の全組織中で強力な構成表現に適応している。オペレーター配列をTATAボックスの直ぐ近くに位置させ、したがってこれとのtetrプレッサー結合は、この領域中で活性の一般の転写ファクターに干渉する。この方法は、新たに形成されたDNA配列、即ちTATAボックスと組合わされたオペレーター配列を、CaMV 35Sプロモーターのエンハンサーによって与えられる異なる表現パターンを与える他のエンハンサーと組合わせることができ

-56

CCCCTAGTCTTCGCAAGACCCCTTTACGTATATAAGGCCTTTCTAGACATTTGCTCGA  
ATCAGAAGCGTTTCAGGGAATGCATATATTCGGAAAGCTCTGTAAACGAGCTCTAG

この合成DNA断片は、次の切断部位を有する：

SpeI: 位置-53~-48からのACTAGT  
SnaBI: 位置-32~-27からのTACGTA  
StuI: 位置-22~-17からのAGGCCT  
XbaI: 位置-15~-10からのTCTAGA  
XhoI: 位置+3~-3からのCTCGAG  
BglII: 位置+2~+7からのAGATCT  
および位置-31~-24からの、プロモーター活性にとって重要である配列TATATAA。

【0075】前記クローン化の結果として、CaMV

AGATCTCTATCACTGATAGGGAGAGTTAACATAACTCTATCACTGATAGAGTGAT  
TCTAGAGATAAGTACTATCCCTCTCAATTGTATTGAGATAAGTACTATCTCACTA

StuI部位は、クローン化の間に失われた。

【0078】クローン化工程後に、位置-56~+61からのオペレーター含有CaMV 35Sプロモーターの

1 10 20 30 40 50 60  
| | | | | | |  
CCCCTAGTCTTCGCAAGACCCCTTTACGTATATAAGGAGATCTCTATCACTGATAGGGAGTG  
GGGTGATCAGAAAGCGTTCTGGGAAATGCATATATTCCTCTAGAGATAGTGAAGTATCCCTCAC  
-56 (位置 1)

70 80 90 100 110  
| | | | |  
TTAACATAACTCTATCACTGATAGAGTGATCCTTTCTAGACATTTGCTCGAGATCT  
AATTGTATTGAGATAGTGAAGTATCTCACTAGGAAAGATCTGTAAACGAGCTCTAGT

+61

(位置 118)

この配列は、次の構造的特徴を有する：

SpeI: 位置4~9からのACTAGT  
SnaBI: 位置25~30からのTACGT  
A

るという利点を有する。

【0073】プロモーターの野生型の場合には、付加的なDNA断片の挿入のための適当な切断部位は存在しないので、一対の塩基-56~+7 (+1は転写出発部位に相当する)からの配列は、次のように変えられた：既に記載したクローニング法 (Gatz and Quail, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 1394~1397)と同様にして、-56~+7の範囲内のプロモーターの野生型の配列を次の一次構造を有する合成DNA断片によって代替した：

【0074】

【化5】

35Sプロモーターは、DNA断片を本明細書中に記載された切断部位中に挿入することができるような程度に変化された。この変化は、プロモーター活性に影響を及ぼさなかった。このプロモーターを以下CaMV (Res.)と呼称する。

【0076】55bp合成配列を、StuI部位中に挿入した。この合成DNAの一次構造は、次の通りである：

【0077】

【化6】

配列は、次の通りである：

【0079】

【化7】

TATAボックス: 位置29~35からのTATATAA  
BglII: 位置38~43からのAGATCT  
T

tetオペレーター：位置41～59からのTCTCT  
ATCACTGATAGGGA

HpaI：位置62～67からのGTTAA  
C

tetオペレーター：位置71～89からのACTCT  
ATCACTGATAGAGT

XbaI：位置97～102からのTCTA  
GA

XhoI：位置109～114からのCTC  
GAG

BglII：位置113～118からのAGA  
TCT

前記配列を植物エンハンサーと組合わせた結果として、  
tetリプレッサーの存在下に植物に読み取られないプ  
ロモーターが形成される。しかし、テトラシクリン誘発  
物質の存在下で、プロモーターは活性である。

【0080】本明細書中で示した例中で、118bp  
DNA断片は、CaMV 35Sプロモーターのエンハ  
ンサーとの組合せ物で存在する（クローン化法に関連し  
て上記参照）。

【0081】野生型CaMV 35Sプロモーターの一  
対の塩基-390～-56ならびにXbaI部位を包含  
する合成配列（位置97～102）を含有する、全体で  
長さ471bpの断片を、EcoRI/XbaI断片の  
形でベクターpGUS（EcoRIおよびXbaIで切  
断した）中にクローン化した。このベクターpGUS  
は、細菌のβ-グルクロニダーゼ（gus）（Jefferso  
n他、EMBO J.（1987）、6、3901～390  
7）のための構造遺伝子の配列を有し、その前面には、  
EcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamH

IおよびXbaIのための切断部位を有するポリリンカ  
ーが位置している。ノパリンシンターゼ遺伝子のポリア  
デニル化信号は、3'末端に位置している。このキメラ  
遺伝子をEcoRI/HindIII断片の形で切断  
し、かつBIN19のEcoRI/HindIII部位  
の間でクローン化した（Bevan, Nucl. Acids Res.（1  
984）12、8711～8720）。次に、キメラハ  
イグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子をノパ  
リンシンターゼプロモーターの制御下にBIN19誘導  
体のHindIII部位中にクローン化し、したがって  
プラスミドpTET1のT-DNAを有する既にカナマ  
イシン耐性の植物の場合に形質転換結果を選択すること  
ができた。また、ハイグロマイシンホスホトランスフェ  
ラーゼ遺伝子の代わりに、別の耐性遺伝子を使用するこ  
ともでき、この場合唯一の例外は、ネオマイシンホスホ  
トランスフェラーゼ遺伝子である。組換え体DNA p  
AT2HyStu4の制限地図は、図3に示されてい  
る。この図は、15kbプラスミドpAT2HyStu  
4が次の断片から構成されていることを説明することを  
意図したものである：切断部位EcoRIとBamHI  
との間には、ポリリンカーの配列が存在し；BamHI  
とSpeIとの間には、CaMV 35Sプロモーター  
のエンハンサーならびに配列CCCを有する334bp  
DNA断片が存在し；SpeIとXbaIとの間に  
は、TATAボックスおよび2個のtetオペレーター  
を有する合成オリゴDNA断片が存在する。

【0082】99bp合成オリゴDNA断片およびCC  
C配列の塩基配列は、次の通りである：

【0083】

【化8】

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
CCCACTAGTCTTCGCAAGACCCCTTTACGTATATAAGGAGATCTCTATCACTGATAGGGAGTG
GGGTGATCAGAAAGCGTTCTGGGAAATGCATATATTCCTCTAGAGATAGTGACTATCCCTCAC.

```

```

70      80      90      100
|      |      |      |
TTAACATAA CTCTATCACTGATAGAGTGATCCTTTCTAGA
AATTGTATT GAGATAGTGACTATCTCACTAGGAAAGATCT

```

XbaIとSacIの間には、β-グルクロニダーゼ  
の構造遺伝子（1800bp）が存在し；SacIとH  
indIIIの間には、ネオパリンシンターゼ遺伝子  
（203bp）のポリアデニル化信号が存在し；2個の  
HindIII部位の間には、ネオパリンシンターゼプ  
ロモーター（1650bp）の制御下でハイグロマイシ  
ンホスホトランスフェラーゼ遺伝子が存在する。Eco

RI部位および第2のHindIII部位の内部の配列  
は、β-グルクロニダーゼ合成の為の情報ならびにハイ  
グロマイシン耐性を表現するための情報を有する。Eco  
RI部位および第2のHindIII部位の外部の配  
列は、ベクターBIN19の配列である。これらの配列  
は、エシェリキア・コリおよびアグロバクテリウム・ト  
ウメファシエンスの場合にプラスミドの複製および選

択、ならびに植物中へのT-DNAの転移およびカナマイシン上で形質転換した植物細胞を選択するためのポテンシャルに対する全機能を有する。耐性は、*nptII*遺伝子または*hptI*遺伝子によって与えられる。

【0084】前記プラスミドをアグロバクテリウム・トウメファシエンス中に形質転換した。次に、タバコ植物中へのDNA転移を、アグロバクテリアと、タバコ植物からの葉の小片との共培養によって実施した。プラスミドpTET1を有し、それ故てトリプレッサーを合成するタバコ植物を形質転換に使用した。テトラシクリンの添加に依存するβ-グルクロニダーゼの合成をてトリプレッサーの存在下でのみ行なう。選択をハイグロマイシン上で実施した。無菌の稔性植物を形質転換した細胞から再生した。

#### 【0085】例3

てトリプレッサーを合成する形質転換したタバコ植物の葉におけるpAT2HyStu4からのβ-グルクロニダーゼ遺伝子のテトラシクリン依存性表現の検出  
全細胞の場合にテトラシクリン誘発物質の均質な吸収をもたらすために、個々の葉にテトラシクリン含有緩衝液を浸透させることによって抗生物質を細胞間隙中に導入した。この目的のために、6個の独立の形質転換した植物の個々の葉を、テトラシクリン10mg/lを含有するクエン酸ナトリウム緩衝液50mMを有するビーカー中に入れた。このビーカーをデシケーター中に置き、かつ真空下に3分間維持した。真空の結果として、空気が細胞間隙から逃出した。この空気をデシケーターからのガス抜きの際に緩衝液によって代替した。浸透後、この葉をテトラシクリン10mg/lを有するMS培地上で16時間インキュベートした。対照の葉を実際に同じ方法で処理したが、しかしテトラシクリンは添加しなかった。次に、葉のRNAを得、アガロースゲル1%に添加し、かつノーザンブロット分析法を行ない、この場合gus mRNAの転写は、β-グルクロニダーゼの構造遺伝子からの放射能標識化された断片を用いてのハイブリッド化によって目で見ることができた。図4に示したRNA分析により、β-グルクロニダーゼのために遺伝子配列を有するmRNAは、葉がテトラシクリンで前処理された場合にのみプラスミドpTET1およびpAT2HyStu4のT-DNAを有する植物中に形成されることが証明される。

【0086】誘発に必要とされるテトラシクリンの最小量を測定するために、プラスミドpTET1およびpAT2HyStu4のT-DNAを有する植物の葉に種々の濃度のテトラシクリンを含有するクエン酸ナトリウム緩衝液50mMを浸透させた。

【0087】葉にクエン酸ナトリウム緩衝液50mM中のテトラシクリンをそれぞれ0（対、照）、0.5、

1.0および10.0mg/lを浸透させ、そのつど等量のテトラシクリン濃度を有するMS培地上に置いた。ノーザンブロット分析法により、テトラシクリン0.1mg/lでさえ最大の誘発に十分であることが示された（図5、位置2参照）。

【0088】gus mRNA誘発の時間依存性を研究するために、プラスミドpTET1およびpAT2HyStu4のT-DNAを有する植物の葉に、テトラシクリン10mg/lを含有するクエン酸ナトリウム緩衝液50mMを浸透させ、それぞれ0、0.5、1、3、6および22時間MS培地上に置いた。テトラシクリン10mg/lの添加により、ほんの30分後にgus mRNAの完全な誘発が生じた（図6、位置2）。

【0089】図5および図6は、同時に、RNA試料がてトリプレッサーの遺伝子のためのmRNAを含有することを示す。mRNAは、その表現が構成的に起こるので、それぞれの図中で位置1で既に目で見ることができ。

【0090】任意の望ましい遺伝子は、例2に記載のクローン化法によりクローン化することができ、例えば任意の望ましい遺伝子は、例2に記載の方法でβ-グルクロニダーゼ遺伝子に関して置換することができる。アグロバクテリウム・トウメファシエンス中の形質転換およびてトリプレッサーを生産することができる植物への転移の後、望ましい生産物は、テトラシクリンの存在下でのみ生産することができる。

#### 【0091】例5

プラスミドpAT2Hyトリプル-Xの製造

上記の調整系の抑制効率を改善することは、以下のクローン化工程の目的であった。それぞれコピーそれ自身が抑制に貢献する場合には、抑制効率がプロモーター内でオペレーターの数とともに増大することは、リン（Lin）およびリグス（Riggs）（Cell 4, 107~111, 1975）によって提案された。それ故、TATAボックスに隣接して3個のオペレーター部位を含有する別のCaMV 35Sプロモーター断片が構成され、この場合1個のオペレーターは、TATAボックスの5'に位置し、TATAボックスの2個のオペレーターは、TATAボックスの3'に位置していた。

【0092】このことは、CaMV 35Sプロモーター誘導体CaMV 35S（Res.）を含有する、上記のプラスミド中に83bp合成配列を挿入することによって達成された。SpeIとXhoI（位置は、上記に記載されている）との間の56bp断片を、次の配列を含有する83bp DNA断片によって交換し

【0093】た：

【化9】

1 10 20 30 40  
 CTAGACTCTATCAGTGATAGAGTGTATATAAGACTCTATCAGTGA  
 TGAGATAGTCACTATCTCACATATATTCTGAGATAGTCACT  
 50 60 70 80  
 TAGAGTGAAGTCTATCAGTGAATACAGTTAACGGTACCT  
 ATCTCACTTGAQATAGTCACTATGTCAATTGCCATGGAGATC

この配列は、次の構造的特徴を有する：

TATAボックス： 位置25～31からのTATA  
TAA

tetオペレーター1：位置5～23からのACTCT  
ATACAGTGATAGAGT

tetオペレーター2：位置33～51からの

tetオペレーター3：位置53～71からの

HpaI： 位置71～76からのGTTA  
AC

KpnI： 位置77～82からのGGT  
S  
CC

生じる変化されたCaMV 35Sプロモーター誘導体を以下CaMV 35S（トリプルX）と呼称する。

【0094】ベクターpGus中へのEcoRI/XbaI断片としてのCaMV 35SトリプルXプロモーターのクローニング、およびその後のリプレッサー蛋白質を合成する形質転換した植物中への前記伝子の導入を、上記のように行なった。

【0095】例5

tetリプレッサーを合成する形質転換したタバコ植物の葉におけるpAT2HyトリプルXからのβ-グルクロニダーゼ遺伝子のテトラシクリン依存性表現の検出

tetリプレッサーと、β-グルクロニダーゼ遺伝子の表現を調整するCaMV 35S（トリプルX）プロモーターとの合成のための情報をコード化するDNA配列を含有する植物をテトラシクリン依存性遺伝子表現に関して分析した。テトラシクリンは、根を通じて有効に引取られ、これはCaMV 35Sプロモーターを含有する3個のオペレーターの制御下に遺伝子の均質な表現を

導く。酵素活性のレベルに対して、誘発物質の不在下での活性は、誘発物質の存在下の場合よりも500分の1低かった。レポーター遺伝子β-グルクロニダーゼの遺伝子生産物は、テトラシクリンで処理された植物においてのみ表現された。また、局所的な誘発は、葉上に直接にテトラシクリンを塗布することによって達成することができる。このことは、図7に証明されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】10.7kbプラスミドpTET1の制限地図。

【図2】形質転換されたタバコ植物中の機能的tetリプレッサーを検査するための電気泳動のオートラジオグラム。

【図3】15kbプラスミドpAT2HyStu4の制限地図。

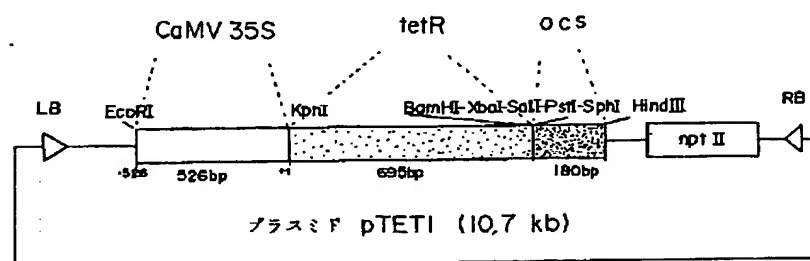
【図4】プラスミドpTET1及びプラスミドpAT2HyStu4のT-DNAを有する形質転換植物の葉からの抽出物中のgus遺伝子のテトラサイクリン依存表現を検査するためのノーザンブロット分析のオートラジオグラム。

【図5】種々の濃度のテトラサイクリンで浸透後の形質転換された植物の葉からの抽出物中のテトラサイクリン誘導と濃度との関係を示すノーザンブロット分析のオートラジオグラム。

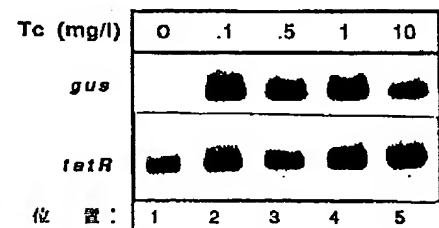
【図6】形質転換植物の葉からの抽出物中のテトラサイクリン誘導と時間との関係を示すノーザンブロット分析のオートラジオグラム。

【図7】形質転換植物の葉中のgus-表現の場所的誘導を示す、葉の組織を示す写真。

【図1】

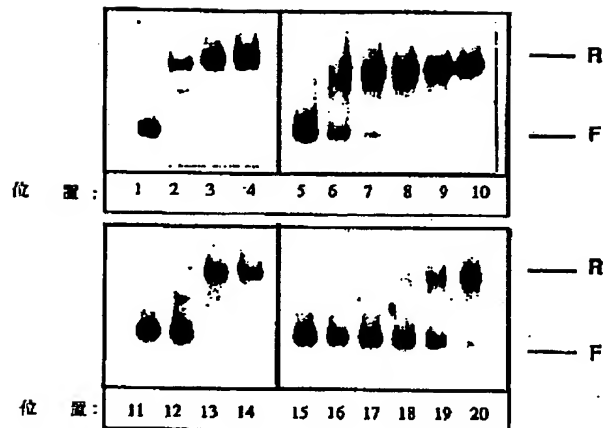


【図5】

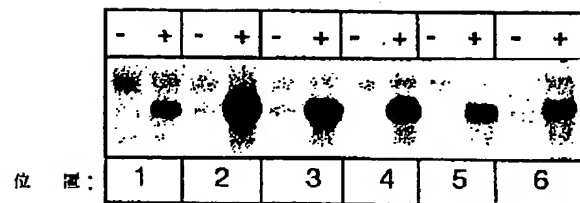




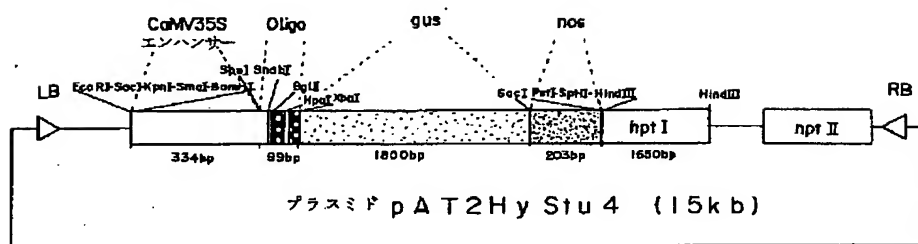
【図2】



【図4】

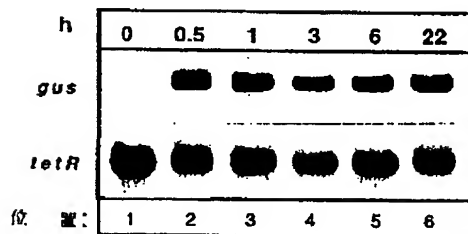


【図3】



tet オペレータ  
TATA-ボックス

【図6】



【図7】



【手続補正書】  
【提出日】平成4年4月3日  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】請求項16  
【補正方法】変更

【補正内容】  
【請求項16】 プラスミドpAT2Hyトリプル-X (DSM6865)。  
【手続補正2】  
【補正対象書類名】明細書



【補正対象項目名】請求項26

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項26】 プラスミドpTET1 (DSM6281)、プラスミドpAT2HyStu4 (DSM6280) 又はプラスミドpAT2Hyトリプル-X (DSM6865) を有する、植物。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項30

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項30】 プラスミドpTET1、pAT2HyStu4及びpAT2Hyトリプル-Xを使用する、特異的DNA配列の表現の時期及び場所をコントロールできる植物の製造。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正内容】

【0045】 プラスミドpTET1 (DSM6281) プラスミドpAT2HyStu4 (DSM6280) プラスミドpAT2Hyトリプル-X (DSM6865) (1972年1月7日寄託)。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正内容】

【0089】 図5および図6は、同時に、RNA試料がtetリプレッサーの遺伝子のためのmRNAを含有することを示す。mRNAは、その表現が構成的に起こるので、それぞれの図中で位置1で既に目で見ることができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

// C12N 5/10

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 クラウス フローベルク

ドイツ連邦共和国 ベルリン 45 モルト

ケシュトラーク 31アー

(72) 発明者 アストリート カイザー

ドイツ連邦共和国 ベルリン 45 カデテ

ンヴェーク11